



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 227 724 A1

4(51) C 12 N 1/16
C 12 N 1/36
C 12 N 1/38

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 266 319 1 (22) 16.08.84 (44) 25.09.85

(71) Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2200 Greifswald, R.-Petershagen-Allee, DD

(72) Uebel, Barbara, Dr. rer. nat.; Bauch, Joachim, Dr. rer. nat.; Genz, Inge-Lore, Dr. rer. nat.; Köhler, Manfred, Prof. Dr. habil.; Büttner, Roland, Dipl.-Biol.; Prah, Thomas, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Synchronisation von Mikroorganismen in kontinuierlichen Kulturen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synchronisation von Mikroorganismen in kontinuierlichen Kulturen zur biotechnischen Stoffwandlung mit Hilfe wachsender Zellen. Ziel und Aufgabe sind, ein Verfahren zur Synchronisation und anschließenden Selbstregulation des synchronen Wachstums von Mikroorganismen in kontinuierlichen Kulturen anzugeben. Dies wird erreicht, indem das Wachstum einer kontinuierlichen Kultur durch ein solches Substrat limitiert wird, das in einer bestimmten Phase des Teilungszyklus verstärkt benötigt wird. Das limitierende Substrat wird nicht kontinuierlich, sondern portionsweise zugegeben, so daß die Zellen, die im Moment der Zugabe die höchste Aufnahmegeschwindigkeit für dieses Substrat haben, in der darauffolgenden Generationszeit nahezu mit $\Delta\mu_{\max}$ wachsen. Der Abstand zwischen den Zugaben muß jeweils gleich der aktuellen Generationszeit dieser Zellen sein. Dieser Abstand wird automatisch eingehalten, indem die Zugaben jeweils dann ausgelöst werden, wenn das b-fache der Nährmediummenge, die einem Kulturvolumen entspricht, zugeflossen ist. Der Faktor b ist charakteristisch für den Synchronisationsgrad der Kultur und kleiner als ln 2.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Synchronisation von Mikroorganismen in kontinuierlichen Kulturen zur biotechnischen Stoffwandlung mit Hilfe wachsender Zellen, wobei von einer substratlimitierend gesteuerten Kultur vom Turbidostat-Typ ausgegangen wird, **gekennzeichnet dadurch**, daß zu der substratlimitierend gesteuerten Kultur portionsweise, jeweils im Abstand von einer Generationszeit der schneller wachsenden Zellen, mindestens ein aus der Nährlösung ausgewähltes limitierendes Substrat gesondert von der Nährlösung zugegeben wird, wobei die Menge der ersten Zugabe des limitierenden Substrates unter 50%, vorzugsweise 3–15% der Nährstoffmenge, die für unlimitiertes Wachstum während einer Generationszeit für die Gesamtbiomassemenge erforderlich ist, und daß bei den folgenden Zugaben die Menge entsprechend dem erreichten Synchronisationsgrad erhöht wird, so daß sie im synchronisierten Betrieb 40–95%, vorzugsweise 60–85% der für die Gesamtbiomasse erforderlichen Nährstoffmenge beträgt und daß das limitierende Substrat in einem solchen Verhältnis zur Biomassekonzentration der Kultur zugeführt wird, daß die Durchflußrate der Kultur vor Beginn der Synchronisation durch diese Limitation auf einen Wert von $D < \mu_{\max}$, vorzugsweise zwischen $0,05 \mu_{\max}$ und $0,2 \mu_{\max}$ herabgesetzt wird.
2. Verfahren zur Synchronisation von Mikroorganismen nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß bei der verwendeten Kultur vom Turbidostat-Typ die Regelung der wachstumsproportionalen Nährlösungszufuhr so aufgebaut ist, daß das Nährmedium portionsweise in gleich großer Menge zugegeben wird, wobei die Anzahl (z) von Portionen, die zusammen ein Kulturvolumen ergeben, vorzugsweise größer als 30 ist, so daß die synchronisierenden Zugaben des limitierenden Substrates nach einer feststehenden Anzahl n von Zugaben des Nährmediums erfolgen, wobei n den Wert $n = b \cdot z \cdot \ln 2$ annimmt.
3. Verfahren zur Synchronisation von Mikroorganismen nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß bei Erreichen des optimalen Synchronisationsgrades der Kultur die Generationszeit g_s der synchron wachsenden Zellen und die Durchflußrate D_s der Kultur als Mittelwert über diese Generationszeit g_s bestimmt werden und daß der erreichte Synchronisationsgrad sowie der für diesen charakteristische Quotient $b = g_s/D_s$ während der weiteren Kultivierung konstant gehalten wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synchronisation von Mikroorganismen in kontinuierlichen Kulturen zur biotechnischen Stoffwandlung mit Hilfe wachsender Zellen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Synchronisation des Wachstum von Mikroorganismen sind aus dem Stand der Technik drei prinzipielle Methoden bekannt.

So ist in Dawson, P. S. S., 1965, Canad. J. Microbiol. 11, S. 893–903 eine Verfahrensweise beschrieben, bei der durch Substratlimitation das Wachstum der Zellen in einem bestimmten Stadium des Teilungszyklus zum Stillstand kommt, von wo aus durch Zugabe des bis dahin limitierenden Substrates der Beginn des synchronisierten Wachstums erfolgt. Die Substratmenge wird so bemessen, daß sie nur für eine Verdopplung der Biomasse ausreicht. Nach jeder Verdopplung der Biomasse wird die Hälfte der Kulturlösung entnommen und durch die gleiche Menge frischen Nährmediums ersetzt. Diese Methode ist bisher nur für die Synchronisation von semikontinuierlichen Kulturen nutzbar. Durch Einsatz dieser Methode bei der Futterhefeherstellung konnte durch eine Reduktion der Kohlenstoffsubstratzufuhr während etwa $1/5$ der Generationszeit der Zellen einer synchronisierten Hefepopulation eine erhöhte Effektivität der Ausnutzung der C-Quelle bei der Biomasseproduktion erzielt werden (Heinritz, B. et al., 1983, Acta Biotechnol. 3, S. 125–131; Kardos, J. et al., Dynamische Grundoperationen der Verfahrenstechnik, Akademie-Verlag Berlin, 1984, S. 107).

Bei der großtechnischen Nutzung dieses Verfahrens können eine Reihe von Schwierigkeiten auftreten. So ist eine genaue Bestimmung der mittleren Generationszeit der Zellen im Großfermentor in jeder Generation notwendig, da die Verdünnung der Kulturlösung erst dann erfolgen darf, wenn sich die Zellzahl verdoppelt hat. Die Bestimmung dieses Zeitpunktes ist bisher für die industrielle Biomasseproduktion oder Produktherstellung auf n-Alkanen oder feststoffhaltigen C-Quellen nicht automatisierbar und erfordert ständige mikroskopische Kontrolle. Kleine Schwankungen bei der Prozeßsteuerung oder der Qualität des Substrates oder Inhomogenitäten im Fermentor können die Generationszeit der Zellen erheblich beeinflussen. Daher ist der geeignete Zugabezeitpunkt nicht genau vorauszuberechnen, und es muß eine größere Anzahl von Proben über einen längeren Zeitraum kontrolliert werden.

Bei einer weiteren Methode wird die erforderliche Wachstumshemmung durch geeignete physikalische Parameter, wie z. B. Temperatur oder pH-Wert, erzielt. Durch eine Aufhebung der das Wachstum hemmenden Umweltbedingungen wird das synchronisierte Wachstum der Population gestartet (Somova, L. A. et al., 1972, Versuch einer Synchronisation kontinuierlicher Kulturen von Hefen (russ.), in: „Nepreryvnoe i periodiceskoe kul'tivirovanie mikroorganizmov“, Krasnojarsk, S. 123–127; Pecurkin, N. S., Terskov, I. A., 1975, „Analyse der Kinetik des Wachstums und der Evolution in Mikroorganismenpopulationen“ (russ.), Nowosibirsk, S. 79–83).

Diese Synchronisierungsverfahren umgehen die Schwierigkeiten der Methode der semikontinuierlichen Kultivierung dadurch, daß sie eine kontinuierliche Kultur nach dem Turbidostat-Prinzip einsetzen. In diesen Kulturen regelt sich die Durchflußrate auf den Wert der spezifischen Wachstumsrate der Zellen. Die Generationszeit g der Zellen kann damit automatisch aus der Durchflußrate D nach der Beziehung $g = \ln 2/D$ bestimmt werden. Turbidostatkulturen sind bei technisch interessanten Biomassekonzentrationen nur dann stabil, wenn alle essentiellen Nährstoffe im Überschuß angeboten werden. Sie arbeiten daher ökonomisch ineffektiv. Die Synchronisation dieser Kulturen wird durch eine solche zeitweilige Temperatur- oder pH-Änderung erreicht, die zu einem Entwicklungsstillstand der Zellen führt, wenn eine bestimmte Phase des Teilungszyklus erreicht ist. Die ungünstige Bedingung muß so lange einwirken, bis praktisch alle Zellen mit der unter diesen Bedingungen herabgesetzten Wachstumsgeschwindigkeit bis zu diesem Stadium des Teilungszyklus herangewachsen sind. Erst dann wird wieder der optimale Wert (z. B. pH oder Temperatur) eingestellt, und es schließt sich eine Generationszeit des synchronen Wachstums bei optimalen Bedingungen an, nach der die Kultur wiederum in dieser bestimmten Phase des Teilungszyklus zum Wachstumsstillstand gebracht wird. Aus diesen beiden Gründen ist dieses Verfahren zur Verbesserung der Ökonomie technischer Verfahren ungeeignet. Nach Romanowski, Stepanova, Cernavski, „Mathematische Modellierung in der Biophysik“ (russ.), Moskau 1975, ist es theoretisch möglich, die Synchronisation einer kontinuierlichen Kultur durch kurzzeitig wirkende wachstumsfördernde Reize im zeitlichen Abstand von einer Generationszeit der synchronisierten wachsenden Zellen zu erreichen. Über eine praktische Realisierung dieses Prinzips im Labor- oder Industriemaßstab ist bisher nichts bekannt. Eine Anwendung

dieses Prinzips auf die üblichen Turbidostatkulturen würde wegen der prinzipiell schlechten Substratnutzung bei diesem Kultivierungsverfahren keine besonderen Vorteile versprechen. Bei der Anwendung auf eine Chemostatkultur bleiben die o.g. Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Generationszeit der synchronisiert wachsenden Zellen bestehen. Um den Nachteil der üblichen Turbidostatkultivierung bei Substratüberschuß zu beseitigen, wird in dem DD-WP C 12 N 260836/1 ein Verfahren zur substratlimitierenden Steuerung kontinuierlicher Kulturen vom Turbidostat-Typ vorgeschlagen. Nach diesem für alle bekannten Formen von Turbidostaten anwendbaren Verfahren wird mindestens eine wachstumsessentielle Komponente des Nährmediums nicht über die der Wachstumsgeschwindigkeit proportionale Regelung, sondern mit konstanter, die Wachstumsrate limitierende Geschwindigkeit zur Kultur zugeführt. Mischlimitationen können bei vorgewählten limitierenden Angeboten der einzelnen Komponenten im Verhältnis zur Biomassekonzentration eingestellt werden. Die dritte prinzipielle Methode zur Synchronisation des Wachstums von Mikroorganismen ist aus Vrana, D., 1976, Biotech. Bioeng. 18, S. 297 bekannt und beinhaltet die Gewinnung von Zellen in gleicher Phase des Teilungszyklus durch Abtrennung der kleinen Knospen einer wachsenden Hefezellpopulation, z.B. durch Zentrifugation und deren Einsatz als Inokulum für eine synchronisiert wachsende batch-Kultur. Diese Methode ist jedoch lediglich für diskontinuierliche Prozesse anwendbar.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Synchronisation von Mikroorganismen in kontinuierlichen Kulturen anzugeben, mit dem die praktische Ausnutzung der Vorteile synchron wachsender Mikroorganismen in kontinuierlich betriebenen biotechnologischen Verfahren verbessert wird und es somit zu einer Steigerung der Effektivität solcher Prozesse kommt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, unter Ausnutzung der Eigenschaften einer substratlimitierend gesteuerten Kultur vom Turbidostat-Typ eine Selbstregelung der Synchronisation der in einer solchen kontinuierlichen Kultur wachsenden Mikroorganismen zu erreichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß von einer substratlimitierend hergestellten Kultur vom Turbidostat-Typ ausgegangen wird. Danach wird eine Komponente der Nährlösung als limitierendes Substrat ausgewählt, die vorwiegend in einer bestimmten Phase des Teilungszyklus von den Zellen benötigt und aufgenommen wird.

Die konstante Zuflußgeschwindigkeit des limitierenden Substrates wird so gewählt, daß die kontinuierliche Kultur auf Grund dieser Limitation mit einer weit unterhalb von $\mu_{\max}$ liegenden spezifischen Wachstumsrate μ_1 wächst. Der Wert von μ_1 sollte im Bereich von $0,01 \mu_{\max}$ bis $0,6 \mu_{\max}$, vorzugsweise im Bereich $0,05 \mu_{\max}$ bis $0,2 \mu_{\max}$ liegen.

Ebenso kann eine beliebige Kultur vom Turbidostat-Typ dadurch in den für die Synchronisation geeigneten Ausgangszustand gebracht werden, daß man nach Erreichen der vorgesehenen Biomassekonzentration nur die Zufuhr der als limitierendes Substrat ausgewählten Komponente abschaltet und das Absinken der spezifischen Wachstumsrate bis zu dem geeigneten Wert abwartet.

Zu einer solchen substratlimitierten kontinuierlichen Auxostatkultur wird zu einem Zeitpunkt t_1 eine bestimmte Menge des limitierenden Substrates zugesetzt. Diese Menge soll so groß sein, daß damit der volle Bedarf derjenigen Zellen gedeckt wird, die sich im Moment dieser Zugabe in dem Stadium ihres Teilungszyklus befinden, in dem der erhöhte Bedarf an dem limitierenden Substrat auftritt. Damit können diejenigen Zellen, die diese Substratmenge bevorzugt aufgenommen haben, für die Dauer einer Generationszeit mit einer spezifischen Wachstumsrate, die größer als μ_1 ist, wachsen. Jeweils im Abstand von einer Generationszeit der schneller wachsenden Zellen erfolgen weitere Zugaben des limitierenden Substrates, wobei die jeweils zugegebene Menge entsprechend dem erreichten Synchronisierungsgrad erhöht wird.

Bei der ersten Zugabe beträgt die zugegebene Menge des limitierenden Nährstoffes unter 50%, vorzugsweise 3–15% der Nährstoffmenge, die für unlimitiertes Wachstum während einer Generationszeit für die gesamte Biomassemenge im Fermentor erforderlich wäre. Bei den folgenden Zugaben wird diese Menge entsprechend dem erreichten Synchronisierungsgrad erhöht. Sie soll im synchronisierten kontinuierlichen Betrieb etwa 40–95% der für die Gesamtbiomasse erforderlichen Nährstoffmenge, vorzugsweise 60–85% dieser Menge betragen.

Zur Bestimmung des Abstandes zwischen den Zugaben werden die Zellen zunächst im gleichen Fermentor bei den vorgesehenen Kultivierungsbedingungen der zu synchronisierenden Kultur nach dem üblichen Auxostatverfahren kultiviert, wobei der für diese Kultivierungsbedingungen zutreffende Wert $D = \mu_{\max}$ gemessen wird.

Nach Beginn der zur Zeit t_1 eingeleiteten Synchronisierung wählt man die Zeit Δt zwischen den Zugaben des limitierenden Substrates entsprechend $\ln 2 / \mu_1 > \Delta t > \ln 2 / \mu_{\max}$. Nach Erreichen eines merklichen Synchronisierungsgrades wird Δt auf den Wert der Generationszeit der synchronisiert wachsenden Zellen eingestellt.

Der im kontinuierlichen Betrieb erreichbare Synchronisierungsgrad liegt unter 100%, da die Konzentration des limitierenden Substrates in der Zeit zwischen den Zugaben möglichst weit unterhalb des für ein Wachstum mit $\mu_{\max}$ notwendigen Wertes liegen soll, d. h. ein bestimmter Teil der Zellen in der Kultur muß stark limitiert wachsen, um die Substratkonzentration auf dem angegebenen niedrigen Wert zu halten.

Die Durchflußrate D dieser Kultur kann während eines Teilungszyklus schwanken. Ein dem Fließgleichgewicht äquivalenter Zustand ist erreicht, wenn der Synchronisierungsgrad und die Generationszeit der synchronisierten Zellen konstante Werte erreicht haben. In diesem Zustand der Kultur ist die spezifische Wachstumsrate μ_g der Gesamtmenge an Biomasse im Fermentor etwas kleiner als die spezifische Wachstumsrate $\mu_s = \ln 2 / g_s$ für die synchronisierten Zellen. Für die Generationszeit g_s und damit für den Abstand Δt zwischen den Zugaben der Kultur muß $\Delta t = g_s = a \cdot \ln 2 / D$ gelten. Der Faktor a ist stets kleiner als 1.

Er wird durch den Synchronisierungsgrad der Kultur bestimmt und ist bei konstantem Synchronisierungsgrad konstant. Fluktuationen oder Verschiebungen der Kultivierungsbedingungen, die die Generationszeit g_s der synchronisierten Zellen verändern, ändern in gleicher Weise die Durchflußrate D der Kultur. Indem man nach Erreichen des gewünschten Synchronisierungsgrades den Faktor a bestimmt und automatisch die Zugabe des limitierenden Substrates jeweils dann auslöst, wenn die Nährlösungsmenge $a \cdot V \cdot \ln 2$ zugeflossen ist (V = Kulturvolumen), bleibt die Synchronisation automatisch auch bei schwankenden Kultivierungsbedingungen erhalten. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß sich der Ausbeutekoeffizient für das limitierende Substrat nicht merklich ändert. Modelluntersuchungen lassen erwarten, daß die Stabilität des Synchronisierungsgrades erhöht wird, wenn Δt ein wenig größer als g_s gewählt wird, vorzugsweise im Bereich $1,01 g_s$ bis $1,1 g_s$, wobei die höheren Werte für kleinere Synchronisierungsgrade angewandt werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispieles näher erläutert werden. Aus der Literatur (Jeter, J. R. et al., 1982, Cytobios, 35, S. 47–62) ist bekannt, daß z. B. Magnesium in bestimmten Zeitintervallen des Teilungszyklus verstärkt von den Zellen benötigt und aufgenommen wird. Demzufolge wird Magnesium zur Synchronisation der Hefekultur als limitierendes Substrat gewählt. Zunächst wird die zu synchronisierende Hefe nach einem Turbidostatprinzip und anschließend mit Mg^{++} -limitierender Steuerung im Laborfermentor gezüchtet. Die Kultivierungsbedingungen sollen denen beim geplanten Produktionsprozeß möglichst ähnlich sein. Das betrifft insbesondere die Biomassekonzentration und den O_2 -Eingang pro Einheit Kulturvolumen. Als Ausgangswerte für die Synchronisation werden dabei folgende Parameter bestimmt: die unter diesen Bedingungen mögliche maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} , die Ertragskoeffizienten des limitierenden Substrates sowohl bei μ_{max} , als auch bei mehreren spezifischen Wachstumsraten im Bereich von $0,01 \mu_{max}$ bis $0,85 \mu_{max}$. Diese Werte werden in der Form $1/Y = f(\mu)$ graphisch dargestellt. Aus dieser Kurve wird der Mg^{++} -Bedarf bei μ_{max} für 2–10% der in der Kultur vorhandenen Biomasse errechnet. Diese Menge ist die 1. Portion, die zu der im steady state befindlichen Mg^{++} -limitiert gesteuerten Kultur zugegeben wird. Nach dieser Zugabe wird der kontinuierliche Mg^{++} -Zulauf abgestellt, wenn das limitierende Substrat nicht die C-Quelle ist. Die nächsten Zugaben erfolgen jeweils im Abstand von wenig mehr als $\ln 2 / \mu_{max}$ Stunden. Die Mg^{++} -Mengen werden von Zugabe zu Zugabe schrittweise erhöht. Bei großer Differenz ($\mu_{max} \cdot D$) können diese Schritte entsprechend größer gewählt werden. Ist ein ausreichender Synchronisationsgrad erreicht, bleiben die Mg^{++} -Mengen je Zugabe konstant. Zu diesem Zeitpunkt wird die Generationszeit der synchron wachsenden Zellen g_s und die Durchflußrate der Gesamtkultur D_s bestimmt. Daraus wird der Faktor $b = a \cdot \ln 2 = g_s D_s$ berechnet. Eine der technisch bekannten Regeleinrichtungen kontrolliert die Durchflußrate D der Kultur und löst die weiteren Mg^{++} -Zugaben jeweils im Abstand von $\Delta t = g_s = b/D$ Stunden aus.

Bei der Maßstabvergrößerung wird prinzipiell in jeder weiteren Stufe das gleiche Synchronisationsverfahren, ausgehend von einem steady state mit substratlimitierender Steuerung, angewandt. Wenn die Ähnlichkeit der Kultivierungsbedingungen mit hinreichender Sicherheit gleiches μ_{max} für nicht Mg^{++} -limitierendes Wachstum sowie gleiche $Y_{Mg^{++}}$ -Werte wie im Laborfermentor erwarten lassen, kann die vorausgehende Kultivierung bei μ_{max} entfallen. Bei dem relativ langsamen Übergang dieser Kulturen in den streng limitierten Zustand, der für die Einleitung der Synchronisation erforderlich ist, bedeutet das erhebliche Zeiteinsparung bei den Stufen mit höherem Kulturvolumina. Der Faktor b muß jedoch in jeder Stufe neu ermittelt werden. Entsprechend dem Steuerprinzip muß diese Bestimmung aber im Prinzip nur jeweils für eine Generationszeit durchgeführt werden. Nur wenn die Möglichkeit einer Veränderung von Y_{H^+} besteht, durch die sich die Biomassekonzentration und damit der Limitations- und Synchronisationsgrad der Kultur verändern würde, ist eine Überprüfung bzw. Neubestimmung des Faktors b erforderlich.